COURS PRATIQUE DE MYCOLOGIE

PUBLIÉ PAR LA *REVUE DE MYCOLOGIE*

Principaux rédacteurs :

G. BLOCH-LAFON, C. FAUVEL, H. ROMAGNESI

Septième fascicule, paru le 1er Août 1939

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
2 AUG. 1939

CHAPITRE II

Notions anatomiques et micrographiques

Conseils techniques

Pour entreprendre une étude satisfaisante des caractères microscopiques essentiels d'un champignon, — caractères dont la connaissance est souvent nécessaire à la détermination précise, — il convient de posséder un bon microscope grossissant au moins 700 à 800 fois. On utilisera un objectif *à sec* (par exemple un objectif 8), avec un oculaire à faible grossissement (1, 2 ou 3). L'emploi d'un objectif à *immersion* (1/12, 1/15) (l'observation se fait alors par l'intercalation d'une goutte d'huile de cèdre dans laquelle baigne l'extrémité de l'objectif) n'est pas indispensable pour l'amateur, mais très recommandable pour la mensuration exacte et l'étude fine des différents éléments du champignon, notamment des spores, des cystides et des basides.

CONSERVATION ET MONTAGE

LIQUIDES DE CONSERVATION ET DE FIXATION. — Les *liquides conservateurs* permettent de garder longtemps ou indéfiniment les fragments de champignons qu'on désire ultérieurement étudier. Leur qualité essentielle requise est de maintenir les cellules avec leur forme et, autant que possible, la plupart des particularités propres à l'état frais.

Le *fixateur* est un liquide qui, agissant sur un organe vivant le tue très rapidement, et fige les éléments constitutifs du protoplasme cellulaire dans l'état où ils se trouvaient au moment où il les pénètre, c'est-à-dire à l'état vivant (où à un état aussi voisin que possible). Un tel liquide *tue* d'abord, puis *fixe*. Sa valeur sera d'autant plus certaine que la première de ces deux actions aura été rapide.

Nous ne nous étendrons pas ici sur les fixateurs spéciaux, dont nous reparlerons dans un autre chapitre, consacré aux notions d'ordre cytologique. Rappelons simplement les fixateurs courants les plus utilisés qui sont en même temps les liquides conservateurs essentiels :

FIXATEURS DE CONSERVATION, jouant en même temps le rôle de liquides de conservation indéfinis :

alcool éthylique (à 95° ou, mieux, *absolu;* l'alcool à 90° ou à degré moindre assure la conservation, mais non une fixation convenable) ;

aldéhyde formique (en solution aqueuse, 5-10 % de formol du commerce) (en fait, seul, le formol est un fixateur médiocre, mais il est à la base de diverses formules complexes de liquides de fixation ; par contre, c'est un excellent liquide de conservation) ;

FIXATEURS D'ÉTUDE, permettant l'examen des enclaves cytoplasmiques :

picro-formol de Bouin (formol : 10 cm^3; eau : 30 cm^3; acide picrique : à saturation; acide acétique cristallisable : 2 cm^3) ;

liquide de Nawaschin (acide chromique à 10 % : 10 cm^3; formol 4 cm^3; acide acétique cristallisable : 1 cm^3) ;

sublimé formolé (solution aqueuse saturée de sublimé : 40 cm^3; formol neutre : 10 cm^3), (on peut ajouter 2 cm^3 d'acide acétique cristallisable).

La fixation, avec ces 3 fixateurs, doit durer environ 48 heures.

Après l'emploi du Bouin, on lave plusieurs fois à l'alcool à 70° jusqu'à enlever la teinture jaune; on lave à l'eau courante pendant 5 heures. Puis on mordance dans la solution d'alun de fer ammoniacal (à 5 %) pendant 12-24 heures, avant d'appliquer les colorants choisis. Ultérieurement, on inclut à la paraffine.

Pratiquement, si l'on veut simplement se réserver l'étude *morphologique* des cellules, on utilisera, comme LIQUIDES CONSERVATEURS :

l'eau formolée (solution de formol à 5-10 %) ;

l'alcool éthylique dilué (solution alcoolique à 60, 70, 80°) ;

l'alcool à brûler pur, et, d'une manière générale, tous les liquides alcooliques;

l'eau glycérinée à laquelle on aura ajouté la moitié d'*alcool;*

le mélange alcool-formol (1 vol. d'alcool à 90° pour 3 de formol à 5 %).

MILIEUX CONSERVATEURS SPÉCIAUX. — A côté de leurs qualités, les liquides conservateurs ci-dessus, et notamment le formol et l'alcool, ont le grand inconvénient de ne pas conserver les couleurs des Champignons, qui, pour la plupart, se dissolvent peu à peu dans ces milieux. Plusieurs auteurs se sont efforcés à mettre au point des mélanges qui soient compatibles avec le maintien de ces pigments. En fait, certains milieux donnent des résultats satisfaisants avec des pigments d'une certaine catégorie chimique, mais dissolvent les autres. On conçoit la difficulté du problème. Nous indiquerons simplement ici quelques formules, la plupart dues à L. Lutz, que les mycologues peuvent essayer, et qui conviennent pour certaines espèces colorées.

Milieu au sulfate de cuivre : eau distillée 600 gr.; alcool à 90° 300 gr.; sulfate de cuivre 25 gr.

Milieu au sulfate de zinc : eau distillée un litre; aldéhyde formique 5 gr.; sulfate de zinc 12 gr. 5.

Milieu à l'acétate mercurique : eau distillée un litre; acide acétique cristallisable 5 cm³; acétate mercurique 1 gr.

Milieux à l'acétate de plomb (recommandés) :

Première formule : eau distillée 1 litre; alcool à 90° 125 gr.; acétate de plomb cristallisé 1 gr.

Deuxième formule : on mélange en parties égales les deux solutions A et B suivantes : A) alcool à 90° 1 litre; acide acétique cristallisable 10 cm³; acétate neutre de plomb 10 gr. — B) acétate mercurique 2 gr.; eau distillée 1 litre; acide acétique cristallisable 5 cm³; acétate mercurique 1 gr.

Dans tous les cas, il est bon de renouveler au bout de 24 heures le milieu dans lequel baigne le champignon qu'on désire conserver. Le nouveau mélange frais est définitif. On bouche le flacon hermétiquement de préférence avec bouchon de liège enduit de paraffine.

LIQUIDES D'OBSERVATION. — Comme liquide d'observation (dans lequel, entre la lame et la lamelle, baignera le fragment de champignon examiné), on utilisera de préférence l'*ammoniaque pure*, qui donne de très bons résultats pour déchiffrer la structure d'un tissu ou d'une cuticule; mais malheureusement, elle s'évapore très vite et ne permet pas de conserver plus d'une heure les préparations. La *liqueur de Melzer* sera utilisée pour vérifier sur les spores et les hyphes certains caractères chimiques (nature amyloïde des membranes et des ornementations). Si l'on désire garder plusieurs jours les préparations, on emploiera *l'acide lactique*, le *bleu lactique*, la *glycérine pure, l'eau glycérinée*, ou encore le *lactophénol d'Amann*, ou l'*hydrate de chloral* en solution aqueuse. Si on désire les conserver indéfiniment, il est nécessaire d'assurer la fermeture parfaite de la préparation au moyen d'un *lut* approprié. Mais on peut aussi utiliser la *gélatine glycérinée* qui peut éviter l'emploi du lut.

L'examen de cellules fraîches peut aussi se faire dans l'*eau* ou dans l'eau légèrement glycérinée. Les échantillons d'herbier ont avantage à être examinés dans l'ammoniaque, l'acide acétique à 45 %, l'acide lactique pur, ou le lactophénol après chauffage prolongé jusqu'au voisinage de l'ébullition.

Nous rappelons ici la composition de ces mélanges liquides d'observation :

Liquides iodo-iodurés (solutions aqueuses d'iode et d'iodure de potassium) dont la meilleure formule, dite de *Melzer*, est la suivante : iodure de potassium 1 g. 5, iode 0 g. 5, eau 20 gr.; chloral 1 gr. pour 1 cm³ du liquide précédent. Après coloration, on examinera soit directement dans ce liquide, soit, mieux, dans une solution aqueuse concentrée d'hydrate de chloral. Au microscope, on examinera de préférence à la lumière du jour. La *liqueur de Kisser*, qui peut être utilisée dans le même but, comporte 8 parties de phénol iodé, 4 d'alcool iodé, 1 d'eau.

Bleu lactique : acide lactique additionné de bleu coton C 4 B (dans le réactif de Guéguen on joint à ce mélange quelques gouttes de teinture d'iode). La concentration la meilleure est de 5 centigr. de bleu coton pour 35 gr. d'acide lactique pur. Il convient de filtrer 24 heures après.

Lactophénol : mélange de glycérine, phénol et acide lactique, dont la meilleure formule dite de *Amann* est la suivante : eau distillée 1 gr., glycérine 2 gr., acide lactique 1 gr., acide phénique pur cristallisé 1 gr. On peut également y dissoudre le bleu C 4 B.

Signalons que le *chloralphénol* permet de rendre transparent des organes durs que le lactophénol n'aura éclairci qu'incomplètement : hydrate de chloral cristallisé 2 parties, acide phénique pur cristallisé 1 partie.

Colorations courantes. — Les colorants ont pour but de colorer *électivement* certaines parties des cellules afin d'en rendre l'examen plus facile. Ici, ne nous intéressent que les colorants d'emploi facile permettant une meilleure différenciation des membranes ou du protoplasme, et non ceux qui s'appliquent au noyau. Nous retiendrons d'abord le *bleu acide Poirrier C 4 B* dit *bleu coton* dont la solution dans l'acide lactique ou le lactophénol permet à la fois coloration et examen, c'est-à-dire qu'on peut observer directement la coupe micrographique sous le microscope dans le milieu colorant (voir ci-dessus).

On peut rendre les préparations plus nettes encore en remplaçant le bleu lactique, qui forme le milieu de montage, par de la glycérine. A

cet effet, il suffit de déposer sur la lame, au contact de la lamelle qui couvre la préparation au bleu lactique, une goutte de glycérine, et de placer au contact du côté opposé, sur l'autre bord de cette lamelle, un fragment de papier buvard. Ce dernier absorbe le bleu lactique, et, par suite, la glycérine, placée de l'autre côté, pénétrera en même temps sous la lamelle où elle remplacera peu à peu le bleu lactique absorbé. La préparation apparaîtra alors en bleu sur le fond incolore constitué par le liquide glycériné d'examen.

On peut également utiliser avec les mêmes avantages que le bleu coton l'*éosine* : on observe alors directement dans une solution aqueuse faible de potasse carbonatée (à 5 %) colorée par l'éosine à l'eau, ou plus simplement dans une solution aqueuse faible (à 1 % d'éosine).

Le *rouge Congo* en solution *ammoniacale* dans l'eau, à 1 %, permet une coloration plus nette des membranes. Les coupes, traitées par l'eau de Javel, puis lavées, séjournent 5 à 6 minutes dans ce colorant. Elles sont lavées à l'eau, puis si possible placées pendant 1 minute dans une solution de sulfate de cuivre à 1 %. On monte à la glycérine ou au lactophénol.

Nous avons signalé plus haut le parti qu'on peut tirer de l'emploi du *liquide iodo-ioduré*. Pour tous ces examens on chauffe *légèrement* au-dessus d'une petite flamme, puis on refroidit *brusquement* sur une surface froide afin d'éliminer les bulles d'air.

Colorations spéciales. — Pour les champignons inférieurs, les bactéries, pour l'examen de conidies ou d'éléments très petits, l'emploi de la *fuchsine basique* selon la formule de Ziehl est recommandable: cette fuchsine phéniquée de Ziehl comporte : fuchsine 1 gr., alcool à 90° 10 gr., eau phéniquée à 1 % 90 gr.

On pulvérise la fuchsine, puis on la dissout dans l'alcool; on ajoute une petite quantité d'eau phéniquée; dès que celle-ci se montre saturée de colorant, on la verse dans le flacon de conservation, puis on ajoute sur le colorant non dissout une nouvelle quantité d'eau phéniquée, et ainsi de suite jusqu'à dissolution totale. On filtre ensuite.

On emploiera aussi avantageusement la solution aqueuse de *bleu de méthylène*, de préférence sous la forme hydroalcoolique (solution mère alcoolique à 95° : 10 cm³, eau distillée pour compléter : 100 cm³).

La *deltapurpurine*, la *benzoazurine*, la *rosazurine* conviennent pour des colorations de membranes, comme le rouge Congo mentionné plus haut, après avoir traité les coupes à l'eau de Javel (pendant 10 à 20 minutes) et lavé à l'eau. On utilise ces colorants pendant 10 minutes et on peut observer directement dans une goutte du colorant dilué (1 % pour la deltapurpurine et la benzopurpurine, 3 % pour la rosazurine). Le *bleu diamine* en solution ammoniacale a l'avantage de rester inaltéré dans le chloral hydraté, milieu dans lequel se fera alors l'examen.

On peut d'ailleurs utiliser avec la même technique de pareilles solutions aqueuses pour colorer la callose au moyen de *bleus acides solubles* (C 4 B, C 6 B, Nicholson 6 B, etc...).

Signalons enfin la réaction au *bleu de crésyl*, mise au point par Kühner, qui permet de colorer certaines hyphes d'Agarics (Mycènes, Marasmes). On écrase le fragment entre deux lames dans une goutte de solution aqueuse concentrée de ce bleu. On enlève la lame supérieure et on ajoute une goutte fraîche de la solution. On attend 10 minutes. On enlève l'excès de bleu avec un papier filtre. On lave à l'eau ordinaire. On observe dans l'eau à la lumière du jour. Certaines parois se colorent en pourpre.

Montage. — Le montage des préparations dans la *gélatine glycérinée* convient spécialement pour les objets préalablement conservés dans la glycérine, l'acide lactique ou le lactophénol. On fera passer, autant que possible ces objets dans des verres de montre renfermant des liquides glycérinés à concentration de plus en plus élevée en glycérine, le dernier ne contenant plus que de la glycérine pure (on laissera, par exemple, de 15 minutes à une heure dans chaque verre de montre, selon la grosseur de l'objet).

Avec une baguette de verre on prélève, pour la placer sur une lame, une goutte du milieu gélatine-glycérinée préalablement fondu au bain-marie, ou bien, avec une aiguille, un petit fragment du même milieu solide, on le place sur la lame qu'on chauffe avec précaution jusqu'à la fusion de la gélatine. Le fragment de tissu, bien égoutté, est porté dans la gouttelette de gélatine glycérinée fondue. Puis on applique sur la goutte accompagnée de l'objet une lamelle, parfaitement propre et sèche, et préalablement passée rapidement dans la flamme. Si l'étalement se fait mal, on repassera rapidement lame et préparation dans la flamme, et l'on pourra parfois appuyer légèrement sur la lamelle avec l'extrémité d'une aiguille. La gélatine glycérinée en excès s'enlève après refroidissement et solidification totale pratiquée sous le robinet à eau froide. On termine le nettoyage en passant un chiffon imbibé d'alcool qui élimine toutes les bavures subsistantes.

On peut luter la préparation ainsi faite, afin de la conserver indéfiniment. Mais on peut aussi se contenter de la garder ainsi, pendant plusieurs semaines.

Préparations définitives. — Ces préparations, en principe inaltérables, peuvent résister à l'épreuve d'un demi-siècle, et même plus, quand elles ont été parfaitement réalisées. Les préparations colorées s'abiment plus facilement, et leur coloration s'atténue peu à peu, en général.

Pour obtenir une préparation définitive, on peut utiliser les milieux solides, ou liquides.

Les milieux solides résultent de la solidification par refroidissement (gélatine glycérinée) ou par évaporation du solvant (baume du Canada ou xylol). Ils peuvent éviter de luter, c'est-à-dire d'enfermer la lamelle dans un mastic périphérique isolant

l'objet, et le milieu qui le renferme, de l'extérieur. Les milieux liquides nécessitent la fermeture *absolue* à l'aide d'un ciment ou lut. Les milieux solides doivent être parfaitement deshydratés, débarrassés de toute trace d'humidité. Sinon, un voile apparaît dans le liquide, rendant l'examen impossible ou malaisé.

Les milieux aqueux ont été examinés plus haut.

Les milieux non aqueux essentiels sont la *gélatine glycérinée* (voir plus haut), le *baume du Canada*, la résine mastic. Le *baume du Canada* se prépare par adjonction de 1/4 de xylol à 3/4 de baume *sec*. La dissolution se fait en 3 jours.

Pour monter une préparation au baume, on place une goutte du milieu sur une lame parfaitement propre et sèche. L'objet, qui a été immergé dans le xylol pur, est égoutté et placé dans la goute de baume. On recouvre avec une lamelle, en prenant toutes précautions d'usage. Il faut proportionner l'importance de la goutte de baume à celle de l'objet et à la surface de la lamelle. S'il en a trop, on la retire avec un fragment de buvard. S'il n'y en a pas suffisamment, on en ajoute sur le bord de la lamelle, en un endroit convenablement choisi.

Les préparations sont conservées à *plat* jusqu'à ce que le milieu soit bien sec et ne risque plus de couler sur la surface de verre.

La *résine mastic* permet d'inclure des objets sortant, non pas d'un milieu absolument anhydre (alcool absolu, xylol pur), mais même un peu hydraté (alcool à 95°). Cet avantage garde sa valeur pour le cas de préparations non colorées. Mais les colorations se conservent mal dans la résine mastic.

On peut utiliser aussi le baume de Canada en mélange, soit avec la résine Dammar (on dissout dans le xylol 1 partie de baume pour 3 parties de résine), soit avec l'huile de ricin.

Pour fermer les préparations, on emploie des *luts* ou ciments, et des *vernis* : mélange paraffine dure, baume de Canada, térébenthine de Venise, vernis au bitume de Judée, maskenlack, ripolin, émail noir pour fourneaux ou mieux lanoline-colophane de Rondeau du Noyer (lanoline anhydre 20 gr., colophane 80 gr.), etc... On chauffe alors modérément le fer à luter (simple gros fil métallique coudé — en cuivre de préférence — porté par un manche en bois) et on le plonge dans le lut qui fond à son contact. On en porte une goutte en fusion aux quatre coins de la lamelle. Au contact du verre, le lut se solidifie instantanément. On bordera alors les quatre côtés en appliquant sur chacun d'eux le fer chargé d'un peu de lut.

Quand la lamelle est ronde, on peut alors réaliser mécaniquement le lutage au moyen d'une Tournette.

Méthodes de coupes.

Il convient de savoir comment prélever les fragments de champignon qu'on destine à l'examen au microscope et qu'on doit fixer, colorer et observer entre lame et lamelle. Trois modes principaux de préparation s'y réfèrent : l'*écrasement*, la *dilacération*, la *coupe*. D'une façon générale, on a toujours tendance à examiner des fragments trop volumineux. C'est par le choix judicieux de la parcelle et non l'importance de sa surface qu'on peut tirer d'utiles enseignements d'un examen micrographique.

Ecrasement. — Technique extrêmement simple et rapide, elle peut être avantageuse pour ces raisons quand elle est employée par une personne avertie, qu'un examen très rapide saura cependant renseigner. Elle s'applique d'autre part à l'observation de parties molles, gélatineuses, diffuses, qui ne sauraient faire l'objet de coupes.

On se contente de prélever un petit fragment du tissu. On le porte sur la goutte de liquide (par exemple bleu lactique) placée au centre de la lame, on laisse imbiber quelques secondes s'il s'agit d'un échantillon frais, plus longtemps si celui-ci est sec ou de constitution très dense; on passe à la flamme; on recouvre d'une lamelle dont le contact avec le liquide se fera obliquement (avant de la laisser choir sur la préparation); on aura peut-être encore avantage à chauffer légèrement puis refroidir brusquement. Ensuite, avec une pointe élastique (porc-épic par exemple) on appuie délicatement ou par petits coups successifs de façon à écraser (plus ou moins, selon le but cherché) le prélèvement. On porte ensuite sous l'objectif.

Dilacération. — On divise délicatement, au moyen d'aiguilles emmanchées (aiguilles simples, aiguilles lancéolées à cataracte), le petit fragment d'organe prélevé, placé dans la goutte de liquide d'examen. Cette dilacération peut se faire à l'œil nu ou sous la loupe (ou sous le microscope-loupe binoculaire). Elle permet un examen plus facile des éléments microscopiques.

On peut aider à cette dissociation par l'emploi d'alcalis dilués (soude ou potasse à 20 %) ou d'acides (acide sulfurique dilué), dans le cas où l'on doit examiner des organes résistants (spores à membrane épaisse, hyphes résistantes), mais cette pratique commande des précautions particulières et des réserves dans l'interprétation de l'examen. Elle sera moins brutale avec l'acide acétique à 45 %, ou après hydrolyse à l'acide chlorhydrique.

(*A suivre*). R. H.

Le secrétaire principal du *Cours pratique* : G. Bloch-Lafon.

Le Mans. — Imprimerie Monnoyer. — 1939.